

A-34376

На правах рукописи

Суховская Ирина Викторовна

**Влияние экологических факторов
на низкомолекулярные пептиды рыб**

Специальность 03.00.04 – биохимия

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук



Петрозаводск – 2004

Работа выполнена в лаборатории экологической биохимии Института биологии Карельского научного центра Российской Академии Наук.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Немова Нина Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Белозерская Татьяна Андреевна

доктор биологических наук
Олейник Виктор Михайлович

Ведущее учреждение: Институт проблем экологической
экологии Севера

Защита состоится февраля 2004 года в часов на заседании диссертационного совета КМ 212.087.01 при Карельском государственном педагогическом университете по адресу: 185035 Республика Карелия, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 17, ауд. 113 главного корпуса.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельского государственного педагогического университета.

Автореферат разослан " " _____ 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Малкин А.И.

Введение

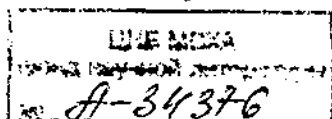
Актуальность проблемы. Для понимания механизмов биохимических адаптаций животных к изменяющимся экологическим факторам важное значение имеет изучение особенностей отдельных сторон метаболизма клеток. Как известно (Мейслер, 1980; Замятнин, 2003), низкомолекулярные пептиды характеризуются чрезвычайно широким функциональным разнообразием. Они участвуют в функционировании нервной, иммунной, эндокринной систем, морфогенезе. А такие пептиды как глутатион и металлотионеины являются неотъемлемой частью защитных реакций от разного рода ксенобиотиков. Тем не менее, исследованию роли низкомолекулярных пептидов в развитии ответных реакций организма на влияние внешних, в том числе антропогенных, факторов уделяется недостаточно внимания, хотя это еще один важный аспект изучения биохимических адаптаций. Особенно отчетливо эту взаимосвязь можно проследить у водных организмов, в частности у рыб, что связано с большей зависимостью холоднокровных животных от условий среды обитания. Актуальность этих исследований определяется не только возможностью получения данных о специфике биохимической организации разных видов животных и особенностях их адаптации в пределах нормы реакции (Слоим, 1971; Шварц, 1980), но и сведений, указывающих на возникновение предпатологий и в дальнейшем патологий в условиях техногенного давления на природу. Такие знания очень важны как для понимания закономерностей эволюции живых организмов, так и для решения обширного круга задач, связанных с тестированием и мониторингом природных сред, необходимых для решения проблем охраны природы и рационального природопользования (Шульман, 1972; Лав, 1976; Шатуновский, 1980; Сидоров, 1983; Лукьяненко, 1987; Флеров, 1989; Хоружая, 1989; Телитченко, Остроумов, 1990; Израэль, 2002).

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось исследование качественного фракционного состава низкомолекулярных (НМ) пептидов в органах некоторых видов пресноводных рыб и выявление их количественных изменений под действием некоторых факторов среды, главным образом, антропогенного происхождения.

Основные задачи настоящей работы заключались в следующем:

- изучить влияние ртути на качественный и количественный состав НМ пептидов тканей окуня и карася в аквариальном эксперименте;
- провести сравнительный анализ качественных и количественных изменений в составе НМ пептидов тканей рыб и крыс, как представителей экто- и эндотермных животных, под действием ртути в модельном эксперименте;
- исследовать влияние некоторых факторов среды обитания на состав НМ пептидов тканей рыб.

Научная новизна. Впервые исследован фракционный состав пептидов с молекулярными массами (Мм) 10 кДа и ниже в тканях некоторых видов



рыб методом жидкостной хроматографии на гелях TSK Toyoparl HW-40S. Показана видовая специфика состава НМ пептидов. Выявлена количественная вариабельность фракций, возникающая при изменении различных параметров водной среды. Впервые проведен сравнительный анализ изменения фракционного состава пептидов у рыб и теплокровных (крыс) позвоночных под действием ртутной нитоксикации.

Практическое значение работы. Работа является частью многолетних исследований, проводимых в лаборатории экологической биохимии Института биологии Карельского научного центра РАН в рамках основных направлений исследований биологических наук РАН (5.15, 5.21) и гранта Президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-894.2003.4). Полученные в ходе работы результаты могут быть использованы при разработке систем эколого-биохимического мониторинга и тестирования экологической обстановки в водоемах. Материал может быть использован при чтении курса лекций «Экологическая биохимия животных» для студентов биологических факультетов ВУЗов.

Положения выносимые на защиту.

1. Фракционный состав пептидов с Мм до 10 кДа, выделенных из разных тканей рыб и крыс, отличается тканевой и видовой спецификой.
2. Пептиды тканей рыб отличаются качественным постоянством, но подвержены количественным вариациям под действием различных факторов среды.
3. Длительное накопление ионов ртути в организме рыб и крыс вызывает количественное перераспределение пептидов по фракциям. Индивидуальные особенности этого явления зависят от возраста и пола животных.

Апробация работы. Основные результаты исследования были представлены на: IV Молодежной научной конференции "Актуальные проблемы биологии и экологии" (Сыктывкар, 1999); 3rd international Lake Ladoga symposium. Monitoring and sustainable management of Lake Ladoga and other large lakes (Petrozavodsk, 1999); Биологические основы изучения, освоения и охраны жив. и раст. мира, почв. покрова Восточной Фенноскандии (Петрозаводск, 1999); IX Всероссийской конф. по экологической физиологии и биохимии рыб (Ярославль, 2000); Международной конференции: Биоразнообразие Европейского Севера (Петрозаводск, 2001); Int. Conf. "Biodiversity of the European North" (Petrozavodsk, 2001); 3rd. International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives (Афины, 2001); III Съезде биохимического общества. (Санкт-Петербург, 2002); 11th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals (Berkeley, California USA, 2002); 21st Workshop "Essentiality and Toxicity of Macro, Trace and Ultratrace Elements" (Germany, 2002); III Республиканской молодежной конференции «XXI век: экологическая наука в Армении» (Ереван, 2002); XI Международном симпозиуме по биоиндикаторам «Современные проблемы биоиндикации и биомониторинга» (Сыктывкар, 2003); Российском симпозиуме по химии и биологии пептидов (Москва, 2003).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 4 статьи.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 170 страницах машинописного текста, включая 37 рисунков и 21 таблицу. Список литературы включает 280 источников, из них 45 отечественные.

Благодарности. Выражаю благодарность д.б.н. В.Т. Комову за постановку аквариальных экспериментов и определение ртути в рыбе на базе ИБВВ РАН. Благодарю за помощь в работе над рукописью и ценные рекомендации к.б.н. Л.П. Смирнова. Искренне признательна всем сотрудникам лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН за постоянную поддержку.

Материалы исследования

Материалом для исследований служили следующие виды рыб: окунь *Perca fluviatilis* L., карась *Carassius auratus* L., плотва *Rutilus rutilus* L., щука *Esox lucius* L. Изучены образцы тканей рыб, выловленных в период с 1999 по 2002 г.г. в озерах с различными гидрохимическими характеристиками и содержанием ртути, расположенных на территории Ярославской и Вологодской областей и Республики Карелии. В качестве объекта сравнения для выявления сходства или различия в реакциях между холоднокровными и теплокровными позвоночными были использованы лабораторные белые беспородные крысы *Rattus norvegicus* L.

Методы исследования

Образец ткани весом 500 мг измельчали, добавляли 0,1 М трис-HCl буферный раствор (pH 7,4) в соотношении 1:2, смесь гомогенизировали. Гомогенат центрифугировали при 20 000 g в течение 15 мин. Супернатант подвергали ультрафильтрации на мембране UM-30. Полученный образец фракционировали методом жидкостной хроматографии низкого давления на носителе TSK Toyopearl HW-40S (диапазон разрешения 1-10 кДа) в хроматографической системе фирмы Farmacia-LKB на колонке K 16x100 (Остерман, 1981). В зависимости от типа ткани образец делился на 5-14 фракций.

Для калибровки колонки использовали белки с известными молекулярными массами (Мм): окситоцин (1 кДа), α - и β -цепи инсулина (2,5 и 3,5 кДа), интактный инсулин (6 кДа).

Полученные путем хроматографии пептидные фракции исследовали спектрофотометрически по экстинкции при длине волны 207 нм (специфичное поглощение пептидных связей) и 250 нм, используемой для выявления меркаптидных связей (Кантор, Шиммель, 1984). Концентрацию пептидов определяли по калибровочному графику зависимости экстинкции при 207 нм от концентрации белка, построенному по бычьему сывороточному альбумину. Для определения количества SH-групп в пептидах помимо прямого спектрофотометрического определения использовали метод Элмана (Ellman, 1959).

Для сравнения с методом Элмана проводили определение количества SH-групп в пептидах тканей рыб по их оптической активности при 250 нм. Обнаружен высокий уровень сходства результатов, который на данном этапе исследований позволил использовать только прямое спектрофотометрическое определение при 250 нм.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятым способом (Кокунин, 1975). Ошибка среднего (m) для фракций с высоким содержанием пептидов не превышала $\pm 5-10\%$ среднего (M), для минорных фракций достигала $\pm 50\%$.

Результаты и их обсуждение.

1. Влияние разных концентраций ртути на состав НМ пептидов печени и мускулатуры позвоночных животных в экспериментальных условиях.

1.1. Состав НМ пептидов тканей окуня *Perca fluviatilis* и карася *Carassius auratus* при аккумуляции разных концентраций ртути.

Окунь.

Эксперименты были проведены на аквариальной базе ИБВВ РАН. В опыте были использованы окуни (печень и мышцы), отловленные в озерах с нейтральным значением pH (Ярославская обл.). До начала эксперимента рыб в течение 20 дней выдерживали в аквариумах. Часть рыб взяли на анализ, и полученные результаты использовали в качестве "исходной" точки. Оставшуюся рыбу разделили на контрольную и опытную группы и в течение 30 суток кормили рыбным фаршем, содержащим соли ртути. Контрольная группа ежедневно получала ртуть в дозе 0,11 мг Hg на кг сырой массы фарша, а опытная — 0,48 мг Hg /кг. Определение ртути в тканях проводили в ИБВВ РАН методом холодного пара, который подробно описан ранее (Степанова, Комов, 1996).

При рассмотрении полученных в эксперименте результатов качественных изменений в пептидном спектре мускулатуре не обнаружено. Увеличение концентрации ртути в мышцах контрольной группы рыб по сравнению с рыбами из "исходной точки" приводило к росту уровня пептидов во фракциях 3,0 и 4,8 кДа (табл. 1).

Таблица 1.

Концентрация белка во фракциях пептидов мускулатуры окуня (мкг/мл)

| Вариант опыта | Молекулярные массы, кДа | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------|---------------|-------|------|---------------|------|---------------|------|------|
| | 6 | 5,5 \pm 0,2 | | 4,8 | 3,0 \pm 0,1 | | 1,7 \pm 0,2 | | |
| | | 5,7 | 5,3 | | 3,1 | 2,9 | 1,8 | 1,7 | 1,6 |
| Исходный уровень | 90,0 | 200,0 | 158,9 | 5,5 | 5,0 | 3,0 | 52,5 | 52,5 | 2,5 |
| Контроль | 95,0 | 178,3 | 144,9 | 17,4 | 33,4 | 47,9 | 47,9 | 43,7 | 11,5 |
| Опыт | 85,0 | 191,0 | 251,8 | 21,4 | 17,4 | 6,6 | 1,1 | 38,0 | 47,9 |

В тканях опытной партии рыб концентрация пептидов во фракциях с Мм 5,5 и 4,8 кДа была выше по сравнению с двумя другими вариантами эксперимента. Во фракции 3,0 кДа содержание пептидов было ниже, чем в контроле, но выше, чем у рыб из "исходной" точки. В субфракциях 1,8 и 1,7 кДа доля пептидов снижалась, а в субфракции 1,6 кДа возрастала.

Анализ фракционного состава пептидов при специфическом поглощении при 250 нм показал, что концентрация этих соединений во фракциях 6,0 и 4,5-5,5 кДа не изменялась на протяжении всего эксперимента. Во фракции с Мм 3,0 кДа у опытных и контрольных рыб наблюдался рост уровня оптической плотности в 2-5 раз по сравнению с особями из "исходной" точки. В мышцах окуней из "исходной" группы наиболее высокий уровень серосодержащих пептидов соответствовал фракции с Мм 1,6 кДа. Пропорционального изменения во фракциях НМ пептидов из мускулатуры рыб, которых кормили фаршем с различным содержанием Hg^{2+} не наблюдалось.

Карась.

Для проведения аквариальных экспериментов были использованы мышцы и печень карасей, выловленных из тех же озер, что и окуни. Условия эксперимента были такими же как и в опытах на окунях, за исключением того, что интоксикация карасей контрольной и опытной групп проводилась в течение 75 суток.

В белковом экстракте мускулатуры рыб выявлены пять фракций с теми же Мм, что и в мускулатуре окуней. В мышцах карасей обнаружен тот же уровень пептидов в подфракции с Мм 5,7 кДа в "исходном" и контрольном вариантах и увеличение доли пептидов у опытных рыб. В подфракции с Мм 5,3 кДа наблюдалось последовательное снижение уровня пептидов в мышцах рыб от "исходной", точки до опытной группы. В подфракции с Мм 4,8 кДа происходило последовательное уменьшение концентрации пептидов. В подфракциях с Мм 3,1 и 1,8 кДа, обнаружен рост уровня пептидов при интоксикации ртутью в 1,4 – 5,5 раза по сравнению с контрольными значениями. В более легких подфракциях наблюдался обратный эффект – концентрация пептидов снижалась.

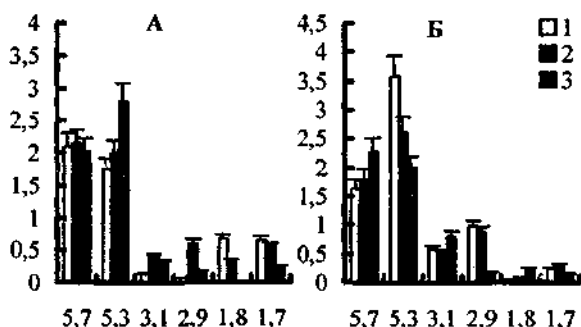


Рис. 1. Изменение уровня пептидов во фракциях экстракта мускулатуры окуней (А) и карасей (Б) при интоксикации ртутью.

1 – «исходная точка»; 2 – контроль; 3 – опыт; по оси ординат – экстинкция при 207 нм; по оси абсцисс – Мм фракций, кДа.

Рост доли пептидных компонентов, оптически активных при 250 нм, показан для фракции 6,0 кДа только у рыб из контрольной группы. Концентрация пептидов в остальных фракциях оставалась практически без изменений во всех вариантах эксперимента.

Сравнительный анализ результатов, полученных для окуней и карасей, не выявил видимых качественных различий в пептидном спектре. Процесс хронической интоксикации ртутью у окуней сопровождался ростом оптической плотности в подфракции 5,3 кДа в 1,6 раза. У карасей, наоборот, в этой подфракции доля пептидов в опытной группе была в 1,8 раза ниже, чем у рыб из "исходной" точки. Разница в динамике изменений количественного состава между окунями и карасями проявилась и в других фракциях (рис. 1).

Различия между окунями и карасями обнаружены и по группе пептидов, оптически активных при 250 нм. Если у первых происходило нарастание доли серосодержащих компонентов по мере снижения Мм, то у вторых максимальный уровень этих пептидов выявлен во фракции 3,1 кДа, а в более легких фракциях их уровень снижался во всех вариантах опыта. Обнаруженные в ходе эксперимента количественные и качественные различия в мышцах окуней и карасей могут свидетельствовать о существовании определенной видовой специфики в реакции исследованных рыб на хроническую интоксикацию ртутью.

Наибольшая часть ртутного загрязнения водоемов связана с неорганической ртутью, фенил-ртутью, ртутью, которая накапливается в донных отложениях. Поэтому в большинстве случаев не обнаруживается корреляции между концентрацией металла в воде и тканях рыб (Mercury in the environment, 1972). Уже давно известно (Miller et al., 1957), что на процессы аккумуляции ртути в организме рыб влияет pH воды, а так же ее температура, цветность, глубина водоема, богатство микрофлоры, которая переводит атомы и ионы ртути в алкил- и арил- производные. Следует, видимо, учитывать и экологическую нишу, которую в процессе эволюции занял тот или иной вид гидробионтов.

Так как доля ртути, поступающая в организм рыб, зависит от типа питания, то у карасей, по-видимому, она должна быть выше, чем у окуней, что и показал анализ уровня ртути в тканях рыб. Кроме этого, караси, дольше, чем окуни пребывающие в придонном водном слое, должны получать из воды больше растворимой ртути, поскольку именно в придонном слое воды создается наиболее высокая концентрация растворимых форм ртути. Влияние фактора времени на процесс накопления ртути в рыбах подтверждают аквариальные эксперименты.

Хорошо заметны различия между окунями и карасями в содержании пептидов в мускулатуре. По-видимому, это связано с видовыми особенностями ответной реакции на ртутную интоксикацию, а также с продолжительностью эксперимента. В мускулатуре карасей происходили менее значительные изменения концентрации пептидов, чем у окуней,

несмотря на изначально более высокий уровень ртути в тканях и двукратное превышение продолжительности эксперимента. Вероятно, уровень толерантности к ртути и к другим факторам у карасей выше, чем у окуней. Давно известен факт, что караси часто бывают единственным видом рыб, которые могут выжить в водоемах с условиями существования, мало пригодными для жизни.

1.2. Состав НМ пептидов тканей крыс при аккумуляции ртути.

Белые лабораторные крысы, как представители теплокровных животных, были использованы с целью сравнения ответной реакции холоднокровных и теплокровных позвоночных на интоксикацию ртутью. Животные были разделены на три группы по 10 особей в каждой без учета их половой принадлежности. Крысам первой группы добавляли в корм нитрат ртути $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ в пересчете на катион по 100 мкг/голову – в течение 14 суток. Животные второй группы получали $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ в том же количестве в течение 30 суток, третья группа служила контролем.

Мускулатура.

Водно-солевые пептидные экстракты из скелетной мускулатуры контрольной группы крыс разделялись на колонках с Toyoperl HW-40S на пять групп фракций.

Качественных изменений фракционного состава пептидов при ртутной интоксикации не обнаружено, однако, наблюдались количественные изменения. Выявлено увеличение концентрации пептидов во всех фракциях на 14-е сутки. Максимальное значение этого показателя характерно для фракции 4,2 кДа. К концу опыта (30 суток) доля пептидов снизилась в 1,4 раза. Во фракции 6,8 кДа сначала происходил рост концентрации пептидов (на 14-е сутки), затем, на 30-й день, уменьшение относительно 14-тисуточного варианта и контроля. Последовательное нарастание доли пептидов по мере накопления ртути в организме крыс обнаружено в самой тяжелой фракции (8,3 кДа) – в 1,7 раза на 14-е сутки и в 6,9 раза на 30-е сутки. В других фракциях также зарегистрировано существенное возрастание доли пептидов на 14-е сутки по сравнению с контролем, которые затем оставались практически неизменными до конца эксперимента.

В составе НМ пептидов мускулатуры крыс выявлено три фракции, оптически активных при 250 нм. На 14-е сутки обнаружено увеличение концентрации пептидов с Мм 3,2 и 6,8 кДа в 1,3 и 2 раза соответственно. На 30-е сутки произошло снижение доли пептидов с Мм 6,8 кДа в 1,8 раза относительно контрольных значений и в 3,7 раза относительно 14-тисуточного варианта, а уровень пептидов с Мм 3,2 кДа практически не изменился.

Печень.

Спектральный анализ, проведенный при длине волны 207 нм, показал, что концентрация пептидов во всех фракциях у опытных крыс на 14 сутки эксперимента снижалась в 2,5–4,0 раз, и этот уровень сохранялся до конца эксперимента.

Динамика количественных изменений фракций, активных при 250 нм, отличалась от таковой общих пептидов. На 14-е сутки у опытных крыс наблюдали резкое снижение концентрации пептидов с Мм 6,1; 2,9 и 2,7 кДа (в 2,7; 2 и 2,3 раза соответственно). Во фракции пептидов Мм 3,5 кДа отмечен рост в 1,6 раза концентрации соединений, поглощающих при 250 нм. На 30-е сутки концентрация пептидов с Мм 6,1 и 2,9 кДа возросла относительно 14-суточного эксперимента в 1,3 и 2,5 раза соответственно.

Почки.

По сравнению с другими исследованными тканями в почках контрольных животных в диапазоне 1-10 кДа выявлено максимальное количество фракций — до 14. На 14-е сутки от начала эксперимента по сравнению с контролем наблюдалось увеличение количества пептидов во всех фракциях, но наиболее заметным оно было во фракциях 5,6; 2,4 — 1,4 кДа. На 30-е сутки продолжился рост концентрации пептидов практически во всех фракциях, но наиболее существенно относительно контрольных значений доля пептидов увеличилась в зонах 1,4; 1,8; 2,4 и 5,1 кДа (в 4,4–7,9 раз). На 14-е сутки эксперимента наблюдался резкий рост концентрации пептидов оптически активных при 250 нм во фракциях 6,1; 3,8; 2,7; 2,0 и 1,5 кДа. Затем, на 30-е сутки уровень пептидов с Мм 6,1; 2,7; 1,5 кДа снизился.

Проведенные эксперименты показали, что количественные изменения фракционного состава НМ пептидов при ежедневном хроническом отравлении нитратом ртути наблюдались уже на 14-й день эксперимента и сохранялись на 30-е сутки. Принимая во внимание литературные данные (Lehman, 1951, Enders, Noetzel, 1965), можно сказать, что использованная в эксперименте доза 100 мкг в пересчете на ион Hg^{2+} достаточна, чтобы оказать токсическое воздействие.

Можно предположить, что на начальном этапе накопления катионы Hg^{2+} оказывали токсическое действие на белковый метаболизм в печени, что выразилось в снижении количества пептидов во всех фракциях. Вероятный механизм этого процесса заключается в том, что ионы двухвалентной ртути по сравнению с другими двухвалентными катионами обладают максимальным сродством к сульфгидрильным группам (Viarengo, Nott, 1993; Viarengo, 1994). Атакуя S-H и S-S связи, ртуть может блокировать работу ферментов, как белкового синтеза, так и протеолиза. На фоне снижения общего уровня пептидов наблюдалось увеличение концентрации соединений, оптически активных при 250 нм. Это может свидетельствовать о том, что ежедневное добавление в корм крысам нитрата ртути не приводило к подавлению механизмов детоксикации в печени до критического уровня. Показано, что в печени задерживается не более 8% ртути, поступающей в организм. Подавляющая ее часть локализуется в почках (Lee et al., 1983). Это согласуется с нашими данными о том, что наибольшие изменения в составе НМ пептидов обнаружены именно в почках. Существенный рост концентрации пептидов в самых НМ фрак-

ших может свидетельствовать об усилении катаболизма белков и развитии патологического процесса в этих органах. Динамика количественных изменений пептидов, поглощающих при 250 нм, дает возможность предполагать, что увеличение доли этих пептидов в первые 14 дней связано с активизацией процессов детоксикации, которые к 30-му дню частично ингибируются в результате непрерывного поступления ртути в организм. Половые различия состава ИМ пептидов тканей крыс при влиянии нитрата ртути.

Крысы были разделены на четыре группы (по 5 особей): 1 – самцы; 2 – самки, которые получали в корм по 100 мкг/голову $Hg(NO_3)_2$ в течение 30 суток; 3 – самцы и 4 – самки, которые действию ртути не подвергались (контроль).

Сравнительный анализ динамики пептидов во фракциях мускулатуры самцов и самок показал, что разнонаправленными тенденциями количественных изменений характеризовались фракции с Мм 6,0 и 5,1 кДа (рис. 2, А). У самцов крыс из экспериментальной группы в период 30-тисуточной интоксикации нитратом ртути в этих фракциях отсутствовали изменения (5,1 кДа) или наблюдался незначительный рост доли пептидов (~ 10%, 6,0 кДа). Во фракциях с меньшей Мм, как у самцов, так и у самок в опытном варианте происходило снижение концентрации пептидов, но показатели этого процесса были разными. Во фракции пептидов с Мм 4,2 кДа доля пептидов снижалась в мышцах самцов в большей степени, чем у самок, а во фракции с Мм 2,3 кДа, наоборот, у самок выявлено в 2,1 раза меньше пептидов, чем у самцов. У самцов из экспериментальной группы в период 30-тисуточной интоксикации нитратом ртути отсутствовали изменения в пептидной фракции с Мм 5,1 кДа и наблюдался незначительный рост доли пептидов во фракции с Мм 6,0 кДа. Во фракциях с меньшей Мм, как у самцов, так и у самок в опытном варианте происходило снижение концентрации пептидов.

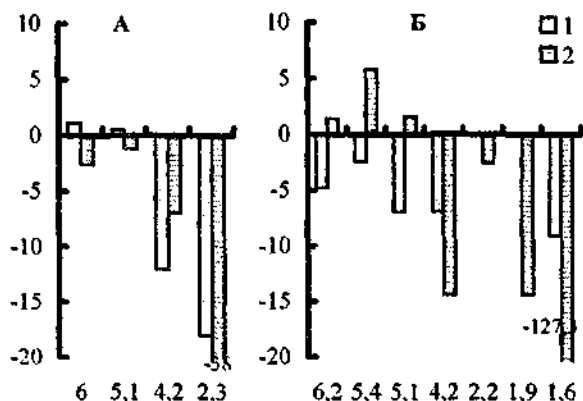


Рис. 2. Динамика содержания ИМ пептидов в мускулатуре (А) и печени (Б) у крыс разного пола при хронической интоксикации нитратом ртути:

1 – самцы; 2 – самки; по оси ординат – кратность относительно контрольных значений; по оси абсцисс – молекулярные массы, кДа.

В печени, в зоне Мм 5,0–6,0 кДа у самцов из опытного варианта концентрация белков была в несколько раз ниже, чем у контрольных особей, а в печени самок интоксикация нитратом ртути стимулировала увеличение доли аналогичных пептидов (рис. 2, Б). Концентрация пептидов с Мм 1,9 и 2,2 кДа у самцов оставалась неизменной на протяжении эксперимента, а у самок опытной группы их доля снижалась в 2,5–14 раз. Уровень пептидов с Мм 1,6 кДа снижался в опытной группе крыс обоих полов, но у самок этот процесс был выражен намного сильнее (в 14 раз), чем у самцов, у которых снижение доли пептидов было 9-тикратным относительно контроля.

1.3. Сравнительный анализ динамики изменений фракционного состава НМ тканевых пептидов животных разных видов.

Исследованные виды позвоночных стоят на разных ступенях эволюционной лестницы, они отличаются и по способу физиологической регуляции температуры тела: рыбы являются эктотермными организмами, а крысы – эндотермными. В составе пептидов мускулатуры крыс было обнаружено больше фракций, чем у рыб. Для крыс, в отличие от рыб, был характерен одинаковый вектор динамики вариабельности параметров для всех фракций (рис. 3). Сначала происходило резкое увеличение доли пептидов, уровень которых затем оставался без изменений до конца эксперимента или незначительно снижался.

У крыс, так же как и у карасей, фракционный состав НМ пептидов печени богаче, чем в мускулатуре, что может свидетельствовать в пользу существования на уровне НМ пептидов специфических различий между тканями позвоночных животных. У рыб во всех фракциях происходило нарастание доли пептидов в исследованных органах от особей первого варианта ("исходная" точка) к рыбам из контрольной группы. При более сильной интоксикации (опытная группа) масса пептидов во всех фракциях была ниже, чем в контроле, что, возможно, связано с торможением их синтеза, но достигнутые значения всегда превышали уровень пептидов в исходном варианте. Возможно, что при более продолжительном (более 75 суток), воздействии ртути на карасей уровень пептидов может снижаться до критически низких значений, вплоть до полной блокировки образования пептидов.

В печени крыс максимальная доля пептидов во всех фракциях обнаружена у животных из контрольной группы. На 14 день произошло снижение относительной доли пептидов. К концу эксперимента наблюдалось ее дальнейшее падение во фракциях с Мм 7,4; 6; 3,5 кДа и весьма незначительный рост во фракциях с Мм 2,9–1,6 кДа.

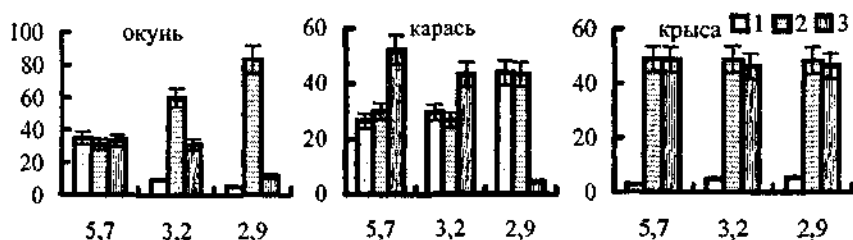


Рис 3. Изменение концентрации пептидов во фракциях мускулатуры рыб и крыс
1 – "исходная" точка у рыб и контроль у крыс; 2 – контроль у рыб и 14 дней у крыс; 3 – опыт; по оси ординат – количество пептидов в % от общей суммы концентраций; по оси абсцисс – молекулярные массы, кДа.

Полученные результаты могут свидетельствовать о существовании в печени и мышцах рыб и крыс определенной специфики ответной реакции на уровне НМ пептидов на ртутную интоксикацию, которая может быть связана с разной резистентностью к токсиканту и являться видоспецифической характеристикой.

2. Влияние разных факторов окружающей среды на состав НМ пептидов тканей рыб из естественных водоемов.

Для определения возможности применения полученных результатов в эколого-биохимических исследованиях было проведено изучение качественных и количественных изменений во фракциях НМ пептидов тканей окуней, выловленных из природных водоемов – озер Чучъярви и Вуонтеленъярви, расположенных на территории республики Карелия, и различающихся по ряду гидрологических и гидрохимических показателей (табл. 2). В мускулатуре окуней из оз. Чучъярви содержалось $0,10 \pm 0,03$ мг ртути на кг сырой массы, а у окуней из оз. Вуонтеленъярви этот показатель был существенно выше и составил $0,53 \pm 0,21$ мг/кг.

Таблица 2.

Гидрологическая и гидрохимическая характеристика озер Чучъярви и Вуонтеленъярви.

| Озеро | Площадь, км ² | Глубина, м | Содержание фосфора, мкг/л | Суммарная минерализация, мг/л | pH |
|------------------------------|--------------------------|------------|---------------------------|-------------------------------|-----------|
| Чучъярви (светловодное) | 0,19 | 8,0 | 6 | 5 | 5,1 – 6,3 |
| Вуонтеленъярви (темноводное) | 0,0424 | 3,0 | 25 – 40 | 10 | 4,5 |

2.1. Возрастные и половые особенности состава НМ пептидов мускулатуры и печени окуней из озер Карелии.

Мускулатура.

Распределение пептидов по фракциям в мускулатуре окуней имело качественное сходство с таковым у рыб, отловленных для аквариальных экспериментов на территории Дарвинского заповедника, за исключением того факта, что в составе НМ пептидов мускулатуры рыб из карельских озер количественно не определялась фракция с Мм 2,8–3,1 кДа. Это может быть связано, во-первых, с тем, что концентрация пептидов данной фракции ниже порога чувствительности регистрирующей аппаратуры и методов, обычно применяемых для детекции пептидов. Во-вторых, это может быть проявлением биохимического полиморфизма популяций географически значительно удаленных друг от друга. В отличие от результатов, полученных в аквариальном эксперименте на карасях и окунях обнаружено, что фракционный состав НМ пептидов мышц окуней обоих полов во всех возрастных группах существенно не зависел от уровня накопленной организмом ртуты. При этом возрастная динамика количественных модификаций НМ пептидов у самок и самцов окуня различается.

Возрастные изменения состава НМ пептидов в мускулатуре самцов.

Самцы окуней из светловодного олиготрофного оз. Чучъярви ("контрольный" водоем) имели иной количественный уровень пептидов во фракциях, чем таковой из темноводного мезотрофного оз. Вуонтеленъярви ("опытный" водоем): доля пептидов с Мм 6,0; 4,8 и 1,6 кДа в мышцах самцов-двухлеток (I возрастная группа) из Чучъярви была выше соответственно в 12,9, 4 и 2,5 раза, чем у таковых из Вуонтеленъярви, а во фракциях с Мм 5,7; 4,6 и 1,8 кДа – в 1,4–3,9 раза ниже.

Возрастные изменения в составе НМ мышечных пептидов у окуней из оз. Чучъярви отсутствовали, за исключением группы пептидов с Мм $1,7 \pm 0,2$ кДа, где наблюдалось снижение уровня в 7–13 раз у окуней в возрасте 4+ (II возрастная группа).

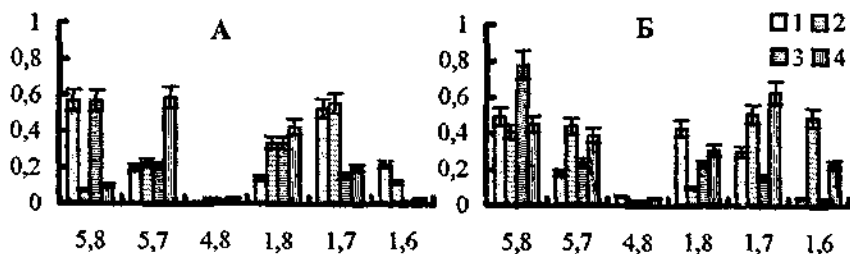


Рис. 4. Возрастные изменения состава пептидов, оптически активных при 250 нм, в мускулатуре самцов (А) и самок (Б) из оз. Чучъярви:

1 – возраст 2+; 2 – возраст 4+; из оз. Вуонтеленъярви: 3 – возраст 2+, 4 – возраст 4+; по оси ординат – экстинкция при 250 нм, по оси абсцисс – молекулярные массы фракций пептидов, кДа

У четырехлетних рыб из оз. Вуонтеленъярви, в тканях которых выявлено в 5 раз больше ртути, чем у рыб из контрольного водоема, уровень пептидов с Мм 1,6 и 1,7 кДа снижался по сравнению с таковым у двухлеток в 3,9–4,2 раза. Наиболее сильное уменьшение концентрации отмечено во фракции 4,8 кДа – в 37 раз. У самцов, как I, так и II возрастной групп из оз. Вуонтеленъярви (опытный водоем) концентрация пептидов с Мм 4,8 кДа ниже, чем у окуней из оз. Чучъярви (контрольный водоем).

Сравнительный анализ данных по экстинкции пептидов при 250 нм показал, что возрастная специфика динамики пептидов с Мм 5,8 кДа заключалась в снижении их уровня у рыб более старшего возраста (рис. 4, А). Сходство возрастной специфики проявилось и для других фракций, однако значения экстинкции при этом существенно различались. Наиболее существенная положительная возрастная динамика (от 2+ до 4+) соединений, поглощающих при 250 нм, отмечена во фракции 5,7 кДа у самцов рыб из оз. Вуонтеленъярви, экологически менее благоприятного. **Возрастные изменения состава НМ пептидов в мускулатуре самок.**

В мускулатуре самок двухлетнего возраста, выловленных из оз. Чучъярви, концентрация пептидов с Мм 4,6 и 1,8 кДа была в 5–8 раз выше, чем у самцов. В мышцах самок из оз. Вуонтеленъярви выявлен более высокий по сравнению с самцами уровень пептидов во всех фракциях, за исключением фракции с молекулярной массой 1,6 кДа.

Сравнительный анализ динамики концентраций пептидов мускулатуры самок показал меньший, по сравнению с самцами, уровень различий между образцами из разных по экологическим условиям озер. Выраженные возрастные изменения, одинаковые для обоих вариантов опыта, выявлены во фракции с Мм 4,6 кДа. При этом обнаружено снижение доли пептидов у четырехлеток по сравнению с двухлетками в 3,6–4,5 раза. Данные, полученные при экстинкции 250 нм показали разный вектор возрастной динамики этой группы пептидов у самок из оз. Чучъярви и Вуонтеленъярви только во фракции с Мм 1,8 кДа (рис. 4, Б).

Таким образом, накопление ртути в организме исследованных рыб оказывает воздействие на процессы обмена пептидов в мускулатуре окуней, более выраженное у 4-х леток, что отражает аккумуляцию ртути в мышцах по мере роста организма. При этом следует отметить, что самцы, по-видимому, более чувствительны к ухудшению экологических условий в водоеме, чем самки, что подтверждается и другими авторами (Williams P.J. et al., 1998). Следует отметить, что в процессе сбора материала обнаружено преобладание самок в уловах из более кислых и загрязненных тяжелыми металлами озер.

Печень.

В печени самцов-двухлеток из оз. Вуонтеленъярви концентрация пептидов во всех фракциях существенно снижена по сравнению с таковыми из оз. Чучъярви. Размах различий составил от 4-ех (во фракциях с

Мм 5,7 и 5,0 кДа) до 30-тикратного (во фракции с Мм 3,3 кДа) значений. Данные по экстинкции при 250 нм показали, что характерным для этой группы пептидов было, также как и для общих пептидов, снижение уровня оптической активности во всех фракциях без исключения.

Показаны также возрастные изменения состава НМ пептидов в печени самок окуней из озер Чучьярви и Вуонтеленъярви. У двухлетних рыб из оз. Вуонтеленъярви (опытный водоем) уровень пептидов в подавляющем большинстве фракций был в 2–8 раз ниже, чем у таковых из оз. Чучьярви (контрольный водоем), а во фракции с Мм 6,9 кДа эта разница достигла 20-тикратных значений. У 4-летних самок из оз. Чучьярви по сравнению с двухлетками отмечен значительный рост концентрации пептидов во фракциях с Мм 4,8; 5; 5,3 и 5,7 кДа. Изменения в остальных фракциях были незначительными. У четырехлеток из оз. Вуонтеленъярви по сравнению с двухлетками отмечено увеличение уровня пептидов в 1,3–10 раз в четырех фракциях (6,9; 5,3; 5,0 и 4,8 кДа) из одиннадцати. А во фракциях с Мм 3,7 и 7,2 кДа доля пептидов была ниже в 1,9–5,6 раза.

У самок в возрасте 4+ из "опытного" водоема концентрация пептидов во фракциях с Мм 4,8 и 5,0 кДа была в 2 раза выше, чем у особей из так называемого "контрольного" водоема, во фракции с Мм 5,7 кДа – в 5 раз, а во фракции с Мм 5,3 кДа эта разница достигла 44 раз. В остальных фракциях доля пептидов в печени четырехлетних самок из оз. Вуонтеленъярви была ниже, чем у особей из оз. Чучьярви. У самок в возрасте 6+ из оз. Чучьярви показатели концентрации пептидов во фракциях почти не отличались от таковых у двухлетних рыб. У шестилетних особей из оз. Вуонтеленъярви отмечен аналогичный эффект за исключением фракции пептидов с Мм 6,9 кДа, в которой с возрастом происходило нарастание уровня пептидов в 6 (4+) и 7 (6+) раз относительно начальных значений (2+). У самок из оз. Чучьярви происходило резкое увеличение с возрастом экстинкции пептидов при длине волны 250 нм во фракции с Мм 6,9 кДа – в 6 и 9 раз, соответственно. Во фракциях с Мм 7,2; 5,7 и 1,8 кДа уровень пептидов сначала снижался, во фракции с Мм 3,5 кДа возрастал, а у шестилеток он вернулся к значениям, выявленным у двухлетних рыб. У самок окуней в возрасте 4+ из оз. Вуонтеленъярви наблюдался значительный рост оптической активности во фракции с Мм 6,9 кДа, которая затем снизилась практически до первоначального значения. Доля пептидов во фракции с Мм 5 кДа с возрастом снижалась, а во фракции с Мм 3,5 кДа возрастала. Наиболее заметные количественные вариации концентрации пептидов обнаруженные у четырехлетних рыб, аккумулировавших больше ртути, вероятно, связаны с физиологическими и биохимическими перестройками, направленными на развитие адаптивных реакций в ответ на негативные факторы среды.

Половые особенности в динамике изменения состава НМ пептидов печени рыб (2+).

У самцов более существенные различия, чем у самок, выявлены в 6 фракциях НМ пептидов из 11 (7,2; 5,3; 3,7; 3,3; 2,7 и 1,8 кДа). У самок значительное снижение концентрации пептидов относительно контроля выявлено во фракциях с Мм 6,9 и 5,7 кДа (в 21 и 35 раз, соответственно). Следует отметить 15-тикратный рост уровня пептидов во фракции 5,0 кДа у самок из загрязненного водоема по сравнению с таковыми из чистого озера, что можно связать с ответной реакцией печени рыб на ухудшение экологической ситуации в воде (рис. 5).

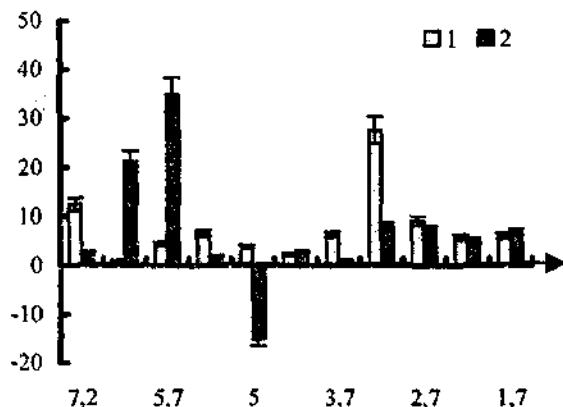


Рис. 5. Половые особенности в реакции НМ пептидов печени окуней в возрасте 2+ на экологическую обстановку в водоемах; 1 – самцы; 2 – самки;

по оси ординат – кратность отношения концентрации пептидов рыб из контрольного водоема (оз. Чудьярви) к таковому опытного (оз. Вуонтеленъярви); по оси абсцисс – шкала молекулярных масс, кДа.

Можно сказать, что ухудшение экологических условий в водоеме (уровень трофности, закисление водоема и, следовательно, более высокий уровень накопления ртути в тканях) вызывает количественные изменения фракционного состава печени исследованных рыб.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что комплекс экологических параметров, сложившийся в оз. Вуонтеленъярви оказывает выраженное отрицательное воздействие на биохимический статус и обменные процессы в организме окуней. При сравнении самцов и самок из озер с разными условиями существования выяснилось, что различия по вариантам из светлого и темного водоемов у первых были выражены сильнее, чем у вторых. Сходные тенденции проявились и в печени окуней. Полученные результаты могут свидетельствовать, о том, что на уровне метаболизма соединений пептидной природы самцы окуней отличаются от самок меньшими адаптивными возможностями (Суховская и др., 2001). Уже отмечалось, что в процессе сбора материала обнаружено преобладание самок в уловах из более кислых и загрязненных тяжелыми металлами озер.

2.2. Фракционный состав пептидов мускулатуры окуней из разных по экологии озер Дарвинского заповедника Вологодской области.

Было проведено сравнительное исследование фракционного состава НМ пептидов мускулатуры окуней, выловленных из озер Дубровское, Мотыкино и Зменное, расположенных на территории Дарвинского заповедника. Озера Дубровское и Зменное это темноводные кислые озера, а Мотыкино – светловодное кислое озеро с минимальным по сравнению с первыми двумя уровнем эвтрофикации.

Исследовали мышечную ткань окуней без учета возраста и половой принадлежности рыбы. Концентрация ртути в мышцах окуней из всех трех озер, практически, не различалась и составляла 0,27–0,61 мг/кг.

Следует отметить факт сходства фракционного состава мышц окуней, выловленных из вышеописанных озер, с таковыми, использованными в аквариальном эксперименте (раздел 1). Обнаружены различия между образцами из разных озер (табл. 3): у окуней из оз. Дубровское во фракциях пептидов с Мм 5,7; 2,9 и 2,6 кДа показан самый высокий по сравнению с другими вариантами уровень пептидов. У рыбы из оз. Зменное такой была фракция с Мм 6,8 кДа, из оз. Мотыкино – число таких фракций было максимальным – 5. В концентрации пептидов во фракциях во всех вариантах есть своя специфика. Но при этом четко проявляется тенденция на сближение уровней пептидов у окуней из оз. Дубровское и Зменное и отличие от рыб оз. Мотыкино. Это отмечено в семи фракциях из одиннадцати, полученных при хроматографии образцов мышц рыб. В остальных пяти фракциях (5,3; 4,8; 1,8; 1,7 и 1,6 кДа) уровень пептидов в мускулатуре рыб из светловодного олиготрофного водоема (Мотыкино) был выше, чем в мышцах окуней из темноводных эвтрофизированных водоемов (Дубровское, Зменное).

Таблица 3.

Концентрация белка (мкг/мл) во фракциях пептидов мускулатуры окуней, выловленных из озер Дубровское (1), Зменное (2) и Мотыкино (3)

| Озеро | Молекулярные массы, кДа | | | | | | | | | |
|-------|-------------------------|---------|-------|------|---------|------|------|---------|------|------|
| | 6 | 5,5±0,2 | | 4,8 | 2,8±0,3 | | | 1,7±0,2 | | |
| | | 5,7 | 5,3 | | 3,1 | 2,9 | 2,6 | 1,8 | 1,7 | 1,6 |
| 1 | 12 | 286,5 | 317,7 | 34,7 | 38,9 | 100 | 41,7 | 2,3 | 47,9 | 43,7 |
| 2 | 60,3 | 273,6 | 310,5 | 22,9 | 2,9 | 18,2 | 10 | 2,3 | 33,1 | 20,4 |
| 3 | 10,0 | 212,4 | 364,8 | 72,4 | 43,7 | 69,2 | 18,2 | 42,7 | 91,2 | 66,1 |

При анализе оптической активности фракций пептидов при 250 нм обнаружен повышенный уровень экстинкции во фракции с Мм 2,9 кДа у окуней из оз. Мотыкино. У рыб из оз. Дубровское концентрация пептидов в этой фракции была минимальной. Для особей из оз. Дубровское характерна более высокая относительно других вариантов оптическая плотность пептидов во фракциях с Мм 6,8 и 6,0 кДа и более низкая в

других фракциях. Стоит отметить, что озеро Дубровское по своим характеристикам наименее пригодно для жизни в нем гидробионтов, что, видимо, и отразилось на уровне низкомолекулярных соединений, оптически активных при 250 нм.

Сравнение состава НМ пептидов мышц окуней озер Республики Карелия и Дарвинского заповедника Вологодской области.

Проведен сравнительный анализ количественных вариаций фракций пептидов в мускулатуре окуней, отловленных в светловодных олиготрофных озерах Чучъярви (Карелия), Мотыкино (Дарвинский заповедник) и темноводных мезотрофных – Вуонтельярви (Карелия) и Дубровское (Дарвинский заповедник). Региональные различия проявились во фракциях с Мм 6,0; 5,3 и 1,7 кДа. Тенденция в изменении концентрации пептидов у рыб из эвтрофизированных водоемов Дарвинского заповедника в этих фракциях была противоположной той, что выявлена для рыб из аналогичных водоемов Карелии.

Ранее было установлено, что набор водорастворимых белков мышц (миогенов) у рыб проявляет высокую степень видовой специфичности (Tsuuyuki et al., 1966; Алтухов, Рычков, 1972), тем не менее, обнаружены и популяционные различия. Необходимо отметить факт качественных отличий между окунями, отловленными в разных регионах. Если у рыб, взятых из разных озер Дарвинского заповедника, отсутствовали различия по фракционному составу пептидов с Мм до 10,0 кДа, то в мышцах особей из озер Карелии не выявлены пептиды с Мм 2,8–3,1 кДа. Это обстоятельство может свидетельствовать о наличии межпопуляционных различий по НМ компонентам пептидной природы между окунями в условиях значительной так называемой "географической разобщенности". Отмечается односторонность в изменении соотношений концентраций пептидов во фракциях с Мм 5,7 и 4,8 кДа в мускулатуре между рыбами из светлых и темных озер вне зависимости от региона вылова. Общим для данного вида рыб является изменение именно во фракциях с Мм 5,7 и 4,8 кДа. Этот процесс, по-видимому, носит адаптивный характер.

Таким образом, можно предположить, что изменение экологических условий в водоеме, сопровождающееся возрастанием уровня эвтрофикации (увеличение цветности воды, концентрации растворенных органических веществ), влияет на клеточный химический метаболизм рыб, в том числе на количественный состав НМ пептидов, образующихся, по-видимому, как в результате индукции синтеза, так и в процессе катаболизма белков.

2.3. Влияние техногенных вод горно-обогатительного комбината на состав НМ пептидов мускулатуры плотвы и щуки.

Плотва.

В составе НМ пептидов, экстрагированных из мышц плотвы, выявлено 5 основных фракций. Показаны существенные различия между рыбами, отловленными в Каскесозере, Карелия (чистый водоем) и в так

называемом "хвостохранилище" техногенных вод Костомукшского ГОКа. В мышцах плотвы из чистого водоема в большинстве фракций уровень пептидов был выше, чем у рыб из загрязненного. Во фракциях $3,3 \pm 0,2$ и $1,7 \pm 0,1$ кДа уровень различий был очень высоким (20–100 раз). А во фракциях 4,2 и 2,1 кДа концентрация пептидов у особей из хвостохранилища была в 5–7 раз выше, чем у таковых из контрольного водоема. Анализ оптической плотности НМ фракций при 250 нм показал очень низкую оптическую активность пептидов у рыб из хвостохранилища по сравнению с образцами из контрольного водоема (рис. 6).

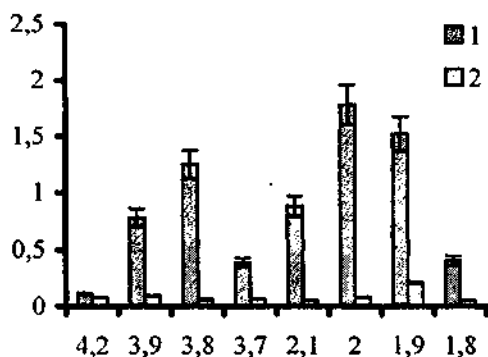


Рис. 6. Оптическая активность при 250 нм во фракциях экстракта НМ пептидов из мышц плотвы.

1 – из Каскесозера; 2 – из хвостохранилища Костомукшского ГОКа; по оси ординат – экстинкция при 250 нм; по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа.

Вода "хвостохранилища" техногенных вод горно-обогатительного комбината признана среднетоксичной (Современное состояние водных объектов республики Карелия, 1998; Поверхностные воды Калевальского района и территории Костомукши в условиях антропогенного воздействия, 2001). Ранее было показано на личинках форели (Смирнов, Кирилюк, 1994), что под действием вод хвостохранилища в тканях рыб наблюдались качественные и количественные изменения фракционного состава НМ пептидов. Полученные результаты свидетельствуют о неблагоприятном воздействии на белковый метаболизм плотвы комплекса химических компонентов, входящих в состав техногенных вод, которые Костомукшский ГОК, накапливает в хвостохранилище. Это подтверждается и результатами исследований других биохимических показателей у рыб в тех же экспериментах (Сидоров и др, 2003). Можно полагать, что плотва находится в состоянии предпатологии, но, этой рыбе присущ сравнительно высокий адаптивный потенциал, она хорошо живет и размножается в этих условиях.

Щука.

Выявлено качественное сходство хроматограмм мышечной ткани щук из исследованных водоемов практически по всем выделенным пептидным фракциям. У щук из контрольного водоема концентрация

пептидов в мышцах была выше, чем у таковых из загрязненного водоема в низкомолекулярной части спектра в 2,2–5,2 раза. В высокомолекулярной части спектра (фракции с Мм 4,8–5,7 кДа) у щук из Каскесозера выявлено в 1,1–3,6 раза меньше пептидов, чем у таковых из хвостохранилища. Наиболее сильные различия выявлены во фракции 3,7 кДа. У рыб из загрязненного водоема концентрация пептидов была в 79 раз выше, чем у особей из чистого.

Анализ компонентов пептидного пула мускулатуры щук при 250 нм (рис. 7) показал, что в мышцах рыб из "хвостохранилища", во всех фракциях уровень оптически активных на этой длине волны соединений был в 1,6–6 раз выше, чем у особей из Каскесозера. Эти данные могут свидетельствовать об адекватной биохимической ответной реакции организма щук на уровне НМ пептидов мускулатуры на экологически неблагоприятный гидрохимический состав водной среды, сложившийся в хвостохранилище Костомукшского ГОКа.

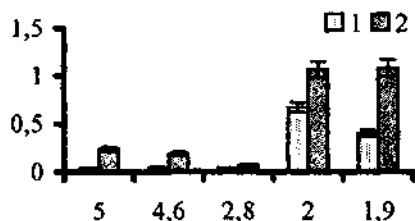


Рис. 7. Оптическая активность при 250 нм во фракциях экстракта НМ пептидов из мышц плотвы.

1 – из Каскесозера; 2 – из хвостохранилища Костомукшского ГОКа; по оси ординат – экстинкция при 250 нм; по оси абсцисс – молекулярные массы фракций, кДа.

Эти данные могут свидетельствовать о том, что у щук в условиях резкого смещения баланса $K^+ : Na^+$ в сторону калия, повышенным уровнем которого характеризуется вода "хвостохранилища", не наблюдается таких нарушений белкового метаболизма, которые были отмечены для плотвы.

На основании проведенных исследований можно предположить рабочую гипотезу о существовании на уровне пептидов и белков многоуровневой системы адаптации у животных к изменяющимся условиям среды. Возможно, что первой мишенью при действии неблагоприятного фактора могут быть низкомолекулярные соединения пептидной природы, имеющие полифункциональную значимость, как например, карнозин (Мм 226 Да) и глутатион (Мм 306 Да – восстановленная и 610 Да – окисленная формы). Затем, после снижения концентрации первых или одновременно с ними реагируют более высокомолекулярные тиолсодержащие пептиды, такие как целая группа металлотионеинов (Мм – 6,0–9,0 кДа). На способности этих полипептидов к перехвату различных ксенобиотиков как органической, так и неорганической природы, основана одна из современных теорий детоксикации (Hamer, 1986), заключающаяся в том, что ксенобиотики не проявляют токсического эффекта, если они не

присутствуют в количествах, превышающих способности металлотиионов связывать их. Если уровень металлов и других катионов возникающих, в частности, в процессе избыточного свободно-радикального окисления, превышает накопительные возможности тиолсодержащих НМ соединений, то первые проявляют токсические свойства через взаимодействия с дисульфидными мостиками высокомолекулярных белков, нарушая их третичную и четвертичную структуры и, соответственно, ферментативную активность. Критическим фактором выживания организмов являются не уровни содержания катионов, а то, с чем они взаимодействуют – с металлотиионинами и другими серосодержащими НМ молекулами или с ферментами. Количественные и качественные изменения в структуре и свойствах высокомолекулярных белков, особенно регуляторных ферментов, приводят в последнюю очередь, потому что любые их повреждения могут привести к существенным нарушениям гомеостаза в организме, в результате которых развиваются различные патологии, а при длительном воздействии токсичного фактора выходят за пределы адаптивных возможностей организма и может наступить его гибель.

Выводы:

1. Пептиды с Мм до 10 кДа из разных тканей рыб и крыс, разделяются методом гель-хроматографии на носителе Toyopearl HW-40S по молекулярным массам на дискретные размерные группы. Количество групп зависит от вида и ткани исследуемого организма.

2. При хронической ртутной интоксикации в аквариальных условиях наблюдаются количественные изменения в составе НМ пептидов в мускулатуре окуней и карасей, что может свидетельствовать об ответной адаптивной реакции на аккумуляцию ртути в организме рыб. Вариабельность количественных показателей во фракциях пептидов характерна как для суммарных пептидов, так и для группы соединений, оптически активных при 250 нм. Показана видоспецифичность фракционного состава низкомолекулярных пептидов.

3. Выявлены сходство и различие в изменении качественного и количественного составов НМ пептидов в ответ на воздействие ртути. Качественный состав тканевых пептидов с молекулярными массами до 10 кДа обладает выраженной тканевой специфичностью. Этот состав пептидов у крыс богаче, чем у рыб, что, вероятно, связано с эволюционным положением, а также с физиологическими особенностями регуляции температуры тела (экто- и эндотермией). Для тканей крыс, в отличие от рыб, характерен одинаковый вектор динамики вариабельности параметров для всех фракций низкомолекулярных пептидов при продолжительной хронической интоксикации ртутью.

4. Обнаружены половые различия в изменении состава тканевых пептидов у окуней и крыс при влиянии разных факторов. Реакция самцов на различного рода воздействия была выражена сильнее, чем у самок. Количественные изменения пептидов связаны с возрастом рыб.

5. Изменения в соотношении концентраций пептидов некоторых фракций в мускулатуре окуней были однонаправленными у рыб из сходных по экологии водосмов (светловодных или темноводных) вне зависимости от региона вылова (Карелия, Ярославская обл., Вологодская обл.).

6. Сдвиг параметров среды обитания (рН, цветность, содержание Hg^{2+} , Na^+/K^+ баланс, техногенное загрязнение) вызывает количественное перераспределение пептидов по фракциям в мускулатуре исследуемых рыб. Индивидуальные особенности этого явления зависят от возраста и вида рыб. Полученные результаты свидетельствуют о роли НМ пептидов в процессах биохимической адаптации исследованных животных к изменяющимся условиям среды.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Суховская И.В., Смирнов Л.П. Влияние ртути на состав низкомолекулярных пептидов некоторых видов рыб и млекопитающих // IV Молодежная научная конференция "Актуальные проблемы биологии и экологии". Сыктывкар. 1999. С. 240–241.

2. Sukhovskaya I.V., Smirnov L.P. The use of the method of low molecular weight peptide's chromatography for the evaluation of ecological effects on the biochemical status of aquatic organisms // 3rd international Lake Ladoga symposium. Monitoring and sustainable management of Lake Ladoga and other large lakes. Petrozavodsk. 1999. С. 69.

3. Суховская И.В., Смирнов Л.П. Влияние рН среды и ртути на состав низкомолекулярных пептидов мышц и печени некоторых видов рыб // Биологические основы изучения, освоения и охраны жив. и раст. мира, почв. покрова Восточной Фенноскандии. Петрозаводск. 1999. С. 165.

4. Суховская И.В., Смирнов Л.П., Сидоров В.С. Влияние различных антропогенных факторов на состав низкомолекулярных пептидов в тканях рыб // IX Всероссийская конф. по экологической физиологии и биохимии рыб. Т. II. Ярославль. 2000. С.150–151.

5. Суховская И.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н. Низкомолекулярные соединения как биохимические индикаторы ртутного загрязнения (сравнительный аспект) // Международная конференция: Биоразнообразие европейского севера. Петрозаводск. 2001. С. 165–166.

6. Sukhovskaya I.V., Nemova N.N., Smirnov L.P. Low molecular weight peptides as a biochemical indicator of mercury pollution // Int. Conf. "Biodiversity of the European North". Petrozavodsk. 2001. P. 320.

7. Суховская И.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н., Комов В.Т. Влияние ртути на фракционный состав низкомолекулярных пептидов мускулатуры окуней *Perca fluviatilis* L. // Вопросы ихтиологии, т.41, № 5. 2001. С. 699–703.

8. Sukhovskaya I.V., Smirnov L.P., Nemova N.N. The effect of mercury nitrate on the fraction composition of low molecular weight peptides of rat tissues // 3rd International Symposium on Trace Elements in Human: New Perspectives. Athens, Greece. 2001. P. 11–12.

9. Sukhovskaya I.V., Smirnov L.P., Nemova N.N. The effect of mercury salt on low-molecular peptide composition of rat tissues // Proceedings Book of 3rd international symposium on trace elements in human: new perspectives. Athens, Greece. 2001. P. 106–114.

10. Суховская И.В., Смирнов Л.П.. Влияние ртути на фракционный состав низкомолекулярных пептидов печени окуней // III Съезд биохимического общества. Санкт-Петербург. 2002. С. 560.

11. Sukhovskaya I.V., Smirnov L.P., Nemova N.N.. The effect of mercury on the fraction composition of low-molecular weight peptides of perch liver and muscle // 11th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals. Berkeley, USA. 2002. P. 140.

12. Sukhovskaya I., Smirnov L., Nemova N. Effect of Hg on low molecular weight peptides of perch and rat livers // 21st Workshope “Essentialy and Toxicity of Macro, Trace and Ultratrace Elements”. Jena, Germany. 2002. P. 676–680.

13. Sukhovskaya I., Smirnov L., Nemova N. Comparative analysis of low molecular weight peptides of perch and rat livers under effect of mercury // Материалы III Республиканской молодежной конференции «XXI век: экологическая наука в Армении». Ереван. 2002. P. 63–64.

14. Nemova N.N., Bogdan V.V., Gurjanova S.D., Krupnova M.Yu., Kaivarainen E.I., Smirnov L.P., Toivonen L.V., Bondareva L.A., Sukhovskaya I. V., Komov V.T. Effects of mercury and water acidification on fish biochemical status // Труды XI Международного симпозиума по биоиндикаторам «Современные проблемы биоиндикации и биомониторинга». Сыктывкар, 2003. 308–318.

15. Суховская И.В., Смирнов Л.П., Немова Н.Н. Изменения в составе низкомолекулярных пептидов печени крыс и окуней под действием солей ртути // Российский симпозиум по химии и биохимии пептидов. Москва. 2003. С. 44.

Изд. лиц. № 00041 от 30.08.99. Подписано в печать 29.12.03. Формат 60×84¹/₁₆.
Бумага офсетная UNION PRINT S. Гарнитура «Times». Печать офсетная.
Уч.-изд. л. 1,3. Усл. печ. л. 1,4. Тираж 100 экз. Изд. № 73. Заказ № 385

Карельский научный центр РАН
185003, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50
Редакционно-издательский

